

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
3 janvier 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/00706 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C07K 14/435

(74) Mandataire : AVENTIS CROPS SCIENCE S.A.; Dépt.
Propriété Industrielle, 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte
postale 9163, F-69263 Lyon Cedex 09 (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR01/02028

(22) Date de dépôt international : 27 juin 2001 (27.06.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(30) Données relatives à la priorité :
00/08374 29 juin 2000 (29.06.2000) FR

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien
(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,
CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : RHO-
BIO [FR/FR]; 14-20, rue Pierre Baizet, Boîte postale 9163,
F-69263 Lyon cedex 09 (FR).

(72) Inventeurs; et

Publiée :

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : LAM-
BERTY, Mireille [FR/FR]; 30, rue Benfeld, F-67100
Strasbourg (FR). BULET, Philippe [FR/FR]; 11, rue
du Cottage, F-67550 Vendenheim (FR). LATORSE,
Marie-Pascale [FR/FR]; Lieu-dit "Le Jannot", F-69210
Sourcieux Les Mines (FR). HOFFMANN, Jules [FR/FR];
5, rue Closener, F-67000 Strasbourg (FR).

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: ANTIMICROBIAL PEPTIDES OF THE FAMILY OF DEFENSINS, POLYNUCLEOTIDES ENCODING SAID PEP-
TIDES, TRANSFORMED VECTORS AND ORGANISMS CONTAINING THEM

(54) Titre : PEPTIDES ANTIMICROBIENS DE LA FAMILLE DES DEFENSINES, POLYNUCLEOTIDES CODANT CES PEP-
TIDES, VECTEURS ET ORGANISMES TRANSFORMES LES CONTENANT

(57) Abstract: The invention concerns novel antimicrobial peptides of the family of defensins, in particular antifungal, called ter-
micines, polynucleotides encoding said peptides, vectors containing them for transforming a host organism and the method for
transforming said organism. The invention also concerns transformed organisms, in particular yeast producing termicine, or plant
cells and plants, the termicines produced by the transformed plants providing them with resistance to fungus-mediated diseases. The
invention further concerns the use of termicines as medicine and pharmaceutical compositions containing them.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet de nouveaux peptides antimicrobiens de la famille des défensines, en particulier
antifongiques, appelés termicines, des polynucléotides codant pour ces peptides, des vecteurs les contenant pour la transformation
d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme. L'invention concerne également des organismes transformés,
en particulier des levures produisant de la termicine, ou des cellules végétales et des plantes, les termicines produites par les plantes
transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique. L'invention concerne également l'utili-
sation des termicines à titre de médicament et les compositions pharmaceutiques les comprenant.

Applicants: Peter David East and Susan
Elizabeth Brown
U.S. Serial No.: 10/590,539
Filed: as §371 national stage of
PCT/AU2005/000234
Exhibit 20

WO 02/00706 A2

Peptides antimicrobiens de la famille des défensines, polynucléotides codant ces peptides, vecteurs et organismes transformés les contenant

La présente invention a pour objet de nouveaux peptides antimicrobiens de la famille des défensines, en particulier antifongiques, appelés termicines, des polynucléotides codant pour ces peptides, des vecteurs les contenant pour la transformation d'un organisme hôte et le procédé de transformation dudit organisme.

L'invention concerne également des organismes transformés, en particulier des levures produisant de la termicine, ou des cellules végétales et des plantes, les termicines produites par les plantes transformées leur conférant une résistance aux maladies, en particulier d'origine fongique.

L'invention concerne également l'utilisation des termicines a titre de médicament et les compositions pharmaceutiques les comprenant.

Dans les domaines de la santé végétale comme dans celui de la santé animale, il existe un besoin permanent d'obtention de nouvelles molécules permettant de lutter contre les infections d'origine fongique. En santé végétale, la protection des cultures contre les maladies fongiques passe essentiellement par la pulvérisation de fongicides de synthèse sur lesdites cultures. Cependant, il existe aujourd'hui un besoin grandissant de rendre les plantes résistantes contre les maladies notamment fongiques afin de diminuer, voire d'éviter, d'avoir recours à des traitements avec des produits de protection antifongiques, en vue de protéger l'environnement. Un moyen d'augmenter cette résistance aux maladies consiste à transformer les plantes de manière qu'elles produisent des substances à même d'assurer leur défense contre ces maladies.

Dans le domaine de la santé humaine et animale, il existe des infections fongiques opportunistes pour lesquelles aucun traitement réellement efficace n'est disponible à l'heure actuelle. En particulier, c'est le cas de certaines mycoses invasives graves qui touchent des patients hospitalisés dont le système immunitaire est déprimé à la suite d'une transplantation, d'une chimiothérapie ou de l'infection par le VIH. En comparaison de l'arsenal des agents antibactériens, la panoplie actuelle des agents antifongiques est très limitée. Il existe donc un besoin réel de caractériser et de développer de nouvelles classes de substances antifongiques.

Le problème technique de la présente invention consiste donc à isoler de nouveaux peptides antifongiques, lesquels peptides trouveront des applications dans les domaines de la protection des cultures, ainsi que dans ceux de la santé et de la nutrition humaines et animales.

On connaît chez les Invertébrés, notamment chez les Insectes, un certain nombre de substances naturellement produites par ces organismes qui leurs confèrent une protection vis-à-vis d'agents pathogènes d'origine bactérienne ou fongique. Ces substances sont généralement des peptides qui sont dits antibactériens, antifongiques ou antimicrobiens selon qu'ils ont une activité
5 préférentielle vis-à-vis des bactéries, des champignons, ou une activité mixte vis-à-vis de ces deux types de pathogènes. Au sens de la présente invention, on entend par bactéricide ou fongicide tant les propriétés bactéricides ou fongicides proprement dites que les propriétés bactériostatiques ou fongistatiques.

Parmi les peptides d'insectes connus, on peut citer ceux décrits dans les demandes de
10 brevets WO 97/30082, WO 99/24594, WO 99/02717, WO 99/53053, et WO99/91089. La difficulté de trouver de nouveaux peptides chez les insectes relève du fait qu'il existe différentes classes de peptides que l'on ne retrouve pas chez tous les insectes, et que des peptides appartenant à une même classe peuvent posséder des propriétés différentes selon les insectes desquels ils sont isolés (Dimarcq et al., 1998, Biopolymers [Peptide science], vol.47, 465-477;
15 Bulet et al., 1999, Dev. Comp. Immunol., vol.23, 329-344).

Au regard des difficultés évoquées ci-dessus, il ressort que l'état de la technique actuel ne permet pas de déduire une activité biologique uniquement à partir de la structure peptidique des peptides antimicrobiens connus. En conséquence, il est donc peu efficace de chercher à créer un nouveau peptide avec une activité antimicrobienne désirée en se basant sur la séquence
20 peptidique de peptides connus. Il est également peu efficace d'utiliser la séquence nucléotidique codant pour un peptide antimicrobien décrit dans l'état de la technique comme sonde pour rechercher des séquences semblables dans des banques de cDNA issues d'autres organismes, excepté lorsque ces autres organismes font partie d'un groupe zoologique restreint, par exemple une famille, au sein duquel une faible variabilité moléculaire existe. La solution au problème
25 technique de la présente invention se trouve donc dans l'isolement de peptides identifiés, dans un premier temps, préférentiellement par leurs propriétés antimicrobiennes plutôt que par leurs structures. Cette solution est obtenue avec la définition de tests *in vitro* d'inhibition de croissance de bactéries, de champignons ou de levures, lesquels tests permettent de cribler des extraits d'un grand nombre d'organismes, en particulier des insectes, pour la présence d'activités vis-à-vis d'au
30 moins un de ces tests.

Dans la définition d'une stratégie d'isolement de nouveaux peptides, il est donc apparu important d'orienter la recherche vers des insectes vivant dans des milieux hostiles en contact

avec des microorganismes pathogènes potentiels, ceci afin d'augmenter les chances de trouver des insectes dont l'arsenal de peptides est particulièrement développé, car adapté à ces milieux. En outre, afin de cibler une activité particulière, il est également possible d'orienter ce criblage vers des insectes dont on suspecte fortement, de par leurs mœurs, qu'ils posséderont des peptides ayant une activité préférentielle vis-à-vis d'un type de microorganisme. C'est cette dernière stratégie qui a été mise en œuvre dans la présente invention afin de répondre au problème technique énoncé ci-dessus. En effet, afin d'isoler de nouveaux peptides antifongiques, il a été choisi de cribler des insectes vivant en contact étroit avec des champignons.

La solution au problème technique consistant à isoler de nouveaux peptides antifongiques a donc été obtenue par l'isolement de nouveaux peptides, les termicines, isolés à partir d'insectes vivant en contact symbiotique avec un champignon, en particulier de termites champignonnistes de la famille des *Macrotermitinae*. Cette famille de termites vit en contact étroit avec un champignon basidiomycète symbiotique du genre *Termitomyces* qui lui assure une digestion efficace des matériaux lignocellulosiques. En particulier, une termicine caractéristique est isolée à partir du termite *Pseudacanthotermes spiniger*. De manière générale, une termicine est un peptide faisant partie de la classe des défensines d'insectes. La classe des défensines d'insectes regroupe majoritairement des peptides antibactériens et/ou antifongiques caractérisés par le fait qu'ils contiennent six cystéines reliées entre-elles par trois ponts dissulfures.

L'invention a donc pour objet de nouveaux peptides, les termicines. Comme prévu par la stratégie décrite ci-dessus, les termicines présentent principalement une activité fongicide, notamment contre les champignons filamenteux responsables des maladies des plantes et les champignons de la pathologie humaine et animale. Après analyse, il apparaît que les termicines possèdent également une activité vis-à-vis des levures de la pathologie humaine, ainsi que des propriétés lytiques ou statiques sur les bactéries à Gram positif. Après avoir synthétisé un gène codant une termicine, on a trouvé qu'il pouvait être inséré dans un organisme hôte, comme une levure ou une plante, afin d'exprimer ladite termicine dans ledit organisme hôte et, soit produire de la termicine purifiée ou non, soit conférer au dit organisme hôte des propriétés de résistance aux maladies fongiques, apportant une solution particulièrement avantageuse aux problèmes énoncés ci-dessus.

La présente invention concerne également des polynucléotides codant pour une termicine telle que définie ci-dessus. Selon la présente invention, on entend par "polynucléotide" une

séquence nucléotidique naturelle ou artificielle pouvant être de type ADN ou ARN, de préférence de type ADN, notamment double brin.

Selon des modes particuliers de réalisation de l'invention, les polynucléotides peuvent être soit synthétisés artificiellement, soit correspondre aux polynucléotides de l'insecte duquel ils sont isolés, soit encore correspondre à des fragments dérivés de ces polynucléotides, adaptés pour l'expression de la termicine dans l'organisme hôte où ladite termicine sera exprimée. Les polynucléotides peuvent être obtenus selon les méthodes standards d'isolation et de purification, ou encore par synthèse selon les techniques usuelles d'hybridations successives d'oligonucléotides synthétiques. Ces techniques sont notamment décrites par Ausubel *et al.* (1987, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Greene, Publ. Wiley & Sons).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, les polynucléotides codant pour la termicine comprennent des polynucléotides codant pour la séquence peptidique décrite par l'identificateur de séquence SEQ ID NO:2. Il est bien connu de l'homme du métier que cette définition inclut tous les polynucléotides qui, bien que comprenant des séquences nucléotidiques différentes comme résultat de la dégénérescence du code génétique, codent pour une même séquence d'acides aminés, laquelle est représentée par l'identificateur de séquences SEQ ID NO: 2.

La présente invention comprend également des polynucléotides isolés codant pour des termicines et capables de s'hybrider de manière sélective à un des polynucléotides précédemment décrits. Par « polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective », on entend selon l'invention les polynucléotides qui, par une des méthodes usuelles de l'état de la technique (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), s'hybrident avec les polynucléotides ci-dessus à un niveau supérieur au bruit de fond de manière significative. Le bruit de fond peut être lié à l'hybridation d'autres polynucléotides présents, notamment d'autres ADNc présents dans une banque d'ADNc. Le niveau du signal généré par l'interaction entre le polynucléotide capable de s'hybrider de manière sélective et les polynucléotides définis par la séquence ID ci-dessus selon l'invention est généralement 10 fois, de préférence 100 fois plus intense que celui de l'interaction des autres séquences d'ADN générant le bruit de fond. Le niveau d'interaction peut être mesuré par exemple, par marquage de la sonde avec des éléments radioactifs, comme le ³²P. L'hybridation sélective est généralement obtenue en employant des conditions de milieu très sévères (par exemple NaCl 0,03 M et citrate de sodium 0,03 M à environ 50°C-60°C).

L'invention comprend également des polynucléotides isolés codant pour des termicines et homologues des polynucléotides précédemment décrits. Par « homologue », on entend selon l'invention des polynucléotides présentant une ou plusieurs modifications de séquence par rapport aux séquences nucléotidiques décrites ci-dessus et codant pour une termicine dont les propriétés ne sont pas significativement altérées. Ces modifications peuvent être obtenues selon les techniques usuelles de mutation conduisant notamment à l'addition, la délétion, ou la substitution d'un ou plusieurs nucléotides par rapport aux séquences de l'invention. De manière avantageuse, le degré d'homologie sera d'au moins 70 % par rapport aux séquences de l'invention, de préférence d'au moins 80 %, plus préférentiellement d'au moins 90 %. Les méthodes de mesure et d'identification des homologies entre les séquences d'acides nucléiques sont bien connues de l'homme du métier. On peut employer par exemple les programmes PILEUP ou BLAST (notamment Altschul et al., 1993, J. Mol. Evol. 36 :290-300 ; Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215 :403-10).

La présente invention concerne également des fragments des polynucléotides décrits ci-dessus. Le terme "fragment" désigne notamment un fragment d'au moins 20 nucléotides, en particulier d'au moins 50 nucléotides, et de préférence d'au moins 100 nucléotides.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, le polynucléotide selon l'invention est représenté par l'identificateur de séquence SEQ ID NO:1.

La présente invention concerne également des polynucléotides comprenant au moins un des polynucléotides tels que décrits précédemment.

Tous les polynucléotides décrits ci-dessus codent des termicine. En conséquence, l'invention s'étend donc à tous les peptides codés par l'ensemble de ces polynucléotides.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, une termicine est un peptide comprenant la séquence peptidique décrite par l'identificateur de séquence SEQ ID NO:2 ou un fragment de cette séquence. Par fragment, on entend essentiellement un fragment biologiquement actif, c'est-à-dire un fragment de la séquence d'une termicine possédant la même activité antimicrobienne qu'une termicine complète.

Le résidu NH₂ terminal d'une termicine peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une acétylation, de même que le résidu C-terminal peut présenter une modification post-traductionnelle, par exemple une amidation.

En outre, une termicine telle que décrite dans la présente invention se distingue des

défensines d'insectes de l'état de la technique par sa structure peptidique, et notamment d'une autre défensine d'insectes, l'héliomicine décrite dans la demande de brevet WO 99/53053, par la caractéristique structurale de posséder un nombre de résidus acides aminés entre les cystéines n°3 et 4 supérieur à 9.

5 Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les résidus cystéine d'une termicine forment au moins un pont disulfure intramoléculaire, de préférence trois ponts disulfures. Selon un mode préférentiel de réalisation de l'invention les ponts disulfures sont établis entre les résidus cystéine 1 et 4, 2 et 5 et 3 et 6.

10 La présente invention concerne également un gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de manière opérationnelle, un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte, un polynucléotide codant pour une termicine tel que défini dans la présente invention, et un élément terminateur fonctionnel dans ce même organisme hôte. Les différents éléments qu'un gène chimère peut contenir sont, d'une part, des éléments régulateurs de la transcription, de la traduction et de la maturation des protéines, tels qu'un promoteur, une séquence codant pour un peptide signal ou un peptide de transit, ou un élément terminateur constituant un signal de polyadénylation, et d'autre part un polynucléotide codant pour une protéine. L'expression "liés entre eux de manière opérationnelle" signifie que lesdits éléments du gène chimère sont liés entre eux de manière à ce que le fonctionnement d'un de ces éléments est affecté par celui d'un autre. A titre d'exemple, un promoteur est lié de manière opérationnelle à une séquence codante lorsqu'il est capable d'affecter l'expression de ladite séquence codante. La construction du gène chimère selon l'invention et l'assemblage de ses différents éléments est réalisable par l'emploi de techniques bien connues de l'homme du métier, notamment celles décrites dans Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press). Le choix des éléments régulateurs constituant le gène chimère est essentiellement fonction de l'espèce hôte dans laquelle ils doivent fonctionner, et l'homme du métier est capable de sélectionner des éléments régulateurs fonctionnels dans un organisme hôte donné. Par "fonctionnels", on entend capables de fonctionner dans un organisme hôte donné.

30 Les promoteurs que peut contenir le gène chimère selon l'invention sont soit constitutifs, soit inductibles. Il apparaît également important que le gène chimère comprenne aussi un peptide signal ou un peptide de transit qui permet de contrôler et d'orienter la production de la termicine

de manière spécifique dans une partie de l'organisme hôte, comme par exemple le cytoplasme, un compartiment particulier du cytoplasme, la membrane cellulaire, ou dans le cas des plantes dans un type particulier de compartiments cellulaires ou de tissus ou dans la matrice extracellulaire.

5 Selon un mode de réalisation, le peptide de transit peut être un signal d'adressage chloroplastique ou mitochondrial, lequel est ensuite clivé dans les chloroplastes ou les mitochondries.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, le peptide signal peut être un signal N-terminal ou "prépeptide", éventuellement en association avec un signal responsable de la
10 rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique, ou un peptide d'adressage vacuolaire ou "propeptide". Le réticulum endoplasmique est le compartiment cellulaire où sont mises en œuvre des opérations de maturation de la protéine produite, comme par exemple le clivage du peptide signal.

Les peptides de transit peuvent être soit simples, soit doubles. Les peptides de transit
15 doubles sont éventuellement séparés par une séquence intermédiaire, c'est à dire qu'ils comprennent, dans le sens de la transcription, une séquence codant pour un peptide de transit d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, une partie de séquence de la partie mature N-terminale d'un gène végétal codant pour une enzyme à localisation plastidiale, puis une séquence codant pour un second peptide de transit d'un gène végétal codant pour une
20 enzyme à localisation plastidiale. De tels peptides de transit doubles sont par exemple décrits dans la demande de brevet EP 0 508 909.

Comme peptide signal utile selon l'invention, on peut citer en particulier le peptide signal du gène PR-1 α du tabac décrit par Cornelissen et al. (1987, Nucleic Acid Res. 15, 6799-6811) en particulier lorsque le gène chimère selon l'invention est introduit dans des cellules végétales ou
25 des plantes, ou le peptide signal du précurseur du facteur Mat α 1 (Brake et al., 1985, In: Gething M.-J. (eds.); Protein transport and secretion, pp.103-108, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York) lorsque le gène chimère selon l'invention est introduit dans des levures.

La présente invention concerne également un vecteur contenant un gène chimère selon l'invention. Le vecteur selon l'invention est utile pour transformer un organisme hôte et exprimer
30 dans celui-ci une termicine. Ce vecteur peut être un plasmide, un cosmide, un bactériophage ou un virus. De manière générale, les principales qualités de ce vecteur doivent être une capacité à se maintenir et à s'autorépliquer dans les cellules de l'organisme hôte, notamment grâce à la

présence d'une origine de répllication, et à y exprimer une termicine. Le choix d'un tel vecteur ainsi que les techniques d'insertion dans celui-ci du gène chimère selon l'invention sont largement décrits dans Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Nolan C. ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) et font partie des connaissances
5 générales de l'homme du métier. De manière avantageuse, le vecteur utilisé dans la présente invention contient également, en plus du gène chimère de l'invention, un gène chimère contenant un marqueur de sélection. Ce marqueur de sélection permet de sélectionner les organismes hôtes effectivement transformés, c'est-à-dire ceux ayant incorporé le vecteur. Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, l'organisme hôte à transformer est une plante. Selon un autre mode
10 de réalisation, l'organisme hôte est un microorganisme, en particulier une levure. Parmi les marqueurs de sélection utilisables, on peut citer des marqueur contenant des gènes de résistance aux antibiotiques tel que, par exemple, celui du gène de l'hygromycine phosphotransférase (Gritz et al., 1983, Gene 25:179-188), mais également des marqueurs contenant des gènes de tolérance aux herbicides tel que le gène *bar* (White et al., NAR 18:1062, 1990) pour la tolérance au
15 bialaphos, le gène EPSPS (US 5,188,642) pour la tolérance au glyphosate ou encore le gène HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. On peut également citer des gènes codant pour des enzymes facilement identifiables comme l'enzyme GUS, des gènes codant pour des pigments ou des enzymes régulant la production de pigments dans les cellules transformées. De tels gènes marqueurs de sélection sont notamment décrits dans les demandes de brevet WO
20 91/02071, WO 95/06128, WO 96/38567, et WO 97/04103.

La présente invention concerne également des organismes hôte transformés, contenant un vecteur tel que décrit ci-dessus. Par organisme hôte, on entend tout organisme mono ou pluricellulaire, inférieur ou supérieur, dans lequel le gène chimère selon l'invention peut être
25 introduit, pour la production de termicine. Il s'agit en particulier de bactéries, par exemple *E. coli*, de levures, en particulier des genres *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, ou *Pichia*, de champignons, en particulier *Aspergillus*, d'un baculovirus, ou de préférence de cellules végétales et de plantes.

Par "cellule végétale", on entend selon l'invention toute cellule issue d'une plante et
30 pouvant constituer des tissus indifférenciés tels que des cals, des tissus différenciés tels que des embryons, des parties de plantes, des plantes ou des semences.

On entend par "plante" selon l'invention, tout organisme multicellulaire différencié

capable de photosynthèse, en particulier monocotylédones ou dicotylédones, plus particulièrement des plantes de culture destinées ou non à l'alimentation animale ou humaine, comme le maïs, le blé, le colza, le soja, le riz, la canne à sucre, la betterave, le tabac, le coton.

On entend par "organisme hôte transformé", un organisme hôte qui a incorporé dans son génome le gène chimère de l'invention, et produit en conséquence une termicine dans ses tissus, ou dans un milieu de culture. Pour obtenir les organismes hôtes selon l'invention, l'homme du métier peut utiliser une des nombreuses méthodes de transformation connues.

Une de ces méthodes consiste à mettre les cellules à transformer en présence de polyéthylène glycol (PEG) et des vecteurs de l'invention (Chang and Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168(1), 111-115; Mercenier and Chassy, 1988, Biochimie 70(4), 503-517). L'électroporation est une autre méthode qui consiste à soumettre les cellules ou tissus à transformer et les vecteurs de l'invention à un champ électrique (Andreason and Evans, 1988, Biotechniques 6(7), 650-660; Shigekawa and Dower, 1989, Aust. J. Biotechnol. 3(1), 56-62). Une autre méthode consiste à directement injecter les vecteurs dans les cellules ou les tissus hôtes par micro-injection (Gordon and Ruddle, 1985, Gene 33(2), 121-136). De manière avantageuse, la méthode dite de "biolistique" pourra être utilisée. Elle consiste à bombarder des cellules ou des tissus avec des particules sur lesquelles sont adsorbés les vecteurs de l'invention (Bruce et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(24), 9692-9696; Klein et al., 1992, Biotechnology 10(3), 286-291; US Patent No. 4,945,050). De manière préférentielle, la transformation de plantes se fera à l'aide de bactéries du genre *Agrobacterium*, de préférence par infection des cellules ou tissus desdites plantes par *A. tumefaciens* (Knopf, 1979, Subcell. Biochem. 6, 143-173; Shaw et al., 1983, Gene 23(3):315-330) ou *A. rhizogenes* (Bevan et Chilton, 1982, Annu. Rev. Genet. 16:357-384; Tepfer and Casse-Delbart, 1987, Microbiol. Sci. 4(1), 24-28). De manière préférentielle, la transformation de cellules végétales par *Agrobacterium tumefaciens* est réalisée selon le protocole décrit par Ishida et al. (1996, Nat. Biotechnol. 14(6), 745-750).

L'homme du métier fera le choix de la méthode appropriée en fonction de la nature de l'organisme hôte à transformer.

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, la présente invention concerne donc également des microorganismes transformés contenant un gène chimère selon l'invention, et exprimant la termicine. La transformation de microorganismes permet de produire de la termicine à échelle semi-industrielle ou industrielle. Le microorganisme à transformer peut être

une levure, un champignon, une bactérie, ou un virus. Selon le microorganisme à transformer, l'homme du métier saura sélectionner les éléments régulateurs du gène chimère permettant d'optimiser la production de termicine. Ces éléments régulateurs sont notamment des séquences promotrices, des activateurs de transcription, des peptides signal ou de transit, des séquences terminatrices et des codons start et stop.

De manière préférentielle, l'organisme hôte transformé est une levure. A titre d'exemple, la transformation d'une levure peut être réalisée avec un vecteur d'expression comprenant un polynucléotide codant la termicine et les éléments suivants :

- des marqueurs permettant de sélectionner les transformants. De préférence, on utilise le gène *ura-3* pour la levure et le gène qui confère la résistance à l'ampicilline pour *E. coli*,
- une séquence nucléique permettant la réplication (origine de réplication) du plasmide dans la levure. De préférence on utilise l'origine de réplication du plasmide 2 μ de levure,
- une séquence nucléique permettant la réplication (origine de réplication) du plasmide dans *E. coli*,
- un gène chimère selon l'invention constitué

(1) d'une séquence de régulation promotrice. On peut utiliser toute séquence promotrice d'un gène s'exprimant naturellement dans la levure. De préférence, on utilise le promoteur du gène *Mfa1* de *S. cerevisiae* tel que décrit dans Betz *et al.* (1987, J. Biol. Chem., 262, 546-548) ou Reichhart *et al.* (1992, Invert. Reprod. Dev., 21, 15-24),

(2) d'une séquence codant pour un peptide signal (ou prépeptide) en association avec un peptide d'adressage (ou propeptide). Ces régions sont importantes pour la sécrétion correcte du peptide. De préférence, on utilise la séquence codant le pré-pro-peptide du précurseur du facteur *Mfa1* tel que décrit dans Betz *et al.* (1987, J. Biol. Chem., 262, 546-548) ou Reichhart *et al.* (1992, Invert. Reprod. Dev., 21, 15-24),

(3) d'un polynucléotide selon l'invention

(4) d'une séquence de régulation terminatrice ou de polyadénylation. De préférence, on utilise le terminateur de la phosphoglycérate kinase (PGK) de *S. cerevisiae*. Dans la cassette d'expression, la séquence codant la termicine est insérée en aval de la séquence pré-pro et en amont du terminateur de la PGK.

Ces éléments ont été décrits dans plusieurs publications dont Reichhart *et al.* (1992, Invert. Reprod. Dev., 21, pp 15-24), Michaut *et al.* (1996, FEBS Letters, 395, pp 6-10) et Lamberty *et al.* (1999, JBC, 274, pp. 9320-9326).

De manière préférentielle, on transforme des levures de l'espèce *S. cerevisiae* avec le vecteur d'expression par la méthode à l'acétate de lithium (Ito et al., 1993, J. Bacteriol, 153. pp 163-168). Les levures transformées sont sélectionnées sur un milieu gélosé sélectif qui ne contient pas d'uracile. La production en masse des levures transformées est réalisée par culture pendant 24 h à 48 h dans un milieu liquide sélectif.

La présente invention concerne donc également un procédé de préparation de la termicine, comprenant les étapes de culture d'un microorganisme transformé comprenant un gène codant pour la termicine tel que défini ci-dessus dans un milieu de culture approprié, puis l'extraction et la purification totale ou partielle de la termicine obtenue. De manière préférentielle, le microorganisme producteur de termicine utilisé est une levure transformée comprenant un gène chimère selon l'invention.

De manière préférée, lors de l'extraction de la termicine produite par les levures, on élimine les levures par centrifugation et on met en contact le surnageant de culture avec une solution acide qui peut être une solution d'un acide minéral ou organique comme par exemple l'acide chlorhydrique ou de l'acide acétique. L'extrait obtenu est ensuite centrifugé à froid à une vitesse de 4000 à 10.000 rpm à 4°C, pendant 30 à 60 min.

La purification de la termicine peut être précédée d'une étape de fractionnement du surnageant obtenu suite à l'étape d'extraction. De manière préférée, au cours de l'étape de fractionnement, l'extrait est déposé sur de la phase inverse pour réaliser une extraction en phase solide. Le lavage des molécules solubles dans l'eau est effectué avec une solution acide diluée et l'élution des molécules hydrophobes avec un éluant approprié. De manière préférentielle, on utilise l'acide trifluoroacétique pour le lavage et un éluant contenant des quantités croissantes d'acétonitrile en solution acide diluée.

De manière avantageuse une seconde étape d'extraction en phase solide est réalisée et préférentiellement sur de la phase échangeuse d'ions. Le lavage des molécules non retenues est effectué dans un tampon salin à pH acide et l'élution des molécules cationiques réalisée par une solution à concentration croissante en sels. La qualité requise pour une bonne fixation des molécules est obtenue avec un tampon acétate d'ammonium à une concentration inférieure à 100 µM. De manière préférentielle, on utilise un éluant contenant un agent chaotrope salin en solution tamponné.

De manière préférée la purification de la termicine est effectuée en une étape HPLC en phase inverse avec un éluant convenable qui peut être différent ou identique à celui de la phase inverse

précédente. Les différentes étapes de la purification sont suivies par un test d'inhibition de croissance fongique et bactérienne en milieu liquide. De préférence, les tests sont effectués avec le champignon *Neurospora crassa*, et la bactérie *Micrococcus luteus*.

La séquence de la termicine produite par les levures transformées est analysée selon la
5 méthode de séquençage par dégradation d'Edman et par spectrométrie de masse. La caractérisation structurale est réalisée directement sur le peptide produit, sur le peptide modifié par réduction/alkylation ainsi que sur des fragments du peptide. La séquence peptidique et la masse moléculaire de la termicine produite ainsi que la concentration minimale inhibitrice (CMI) contre le champignon filamenteux *Neurospora crassa* ont été comparées avec celles d'une
10 termicine de référence, la termicine native extraite des corps entiers de *Pseudacanthotermes spiniger*. Les résultats montrent que les deux molécules présentent la même structure primaire à l'exception de la présence d'un acide aminé supplémentaire C-terminal dans la molécule recombinante, à savoir un reste peptidique constitué d'un acide aminé de préférence la glycine (Gly) pour remplacer l'amidation C-terminale du reste peptidique représenté par l'acide aminé C-
15 terminal amidé de la molécule naturelle à savoir le reste peptidique constitué de l'acide aminé - Arg-amide. La détermination de la position des ponts disulfure indique que l'arrangement des ponts disulfures est identique dans les deux peptides, natif et produit par le microorganisme transformé.

20 L'invention concerne également des plantes transformées contenant un gène chimère selon l'invention et exprimant dans leurs tissus une termicine selon l'invention, ladite termicine conférant à ces plantes une résistance vis-à-vis d'organismes pathogènes. Le gène chimère utilisé pour obtenir des plantes transformées selon l'invention peut contenir un promoteur constitutif ou un promoteur inductible. Comme promoteur, on peut utiliser tout promoteur d'un gène
25 s'exprimant naturellement dans les plantes en particulier un promoteur d'origine bactérienne, virale ou végétale. Parmi les promoteurs constitutifs qui peuvent être utilisés dans le gène chimère de la présente invention, nous pouvons citer à titre d'exemple, des promoteurs bactériens, comme celui du gène de l'octopine synthase ou celui du gène de la nopaline synthase, des promoteurs viraux, comme celui du gène contrôlant la transcription des ARN19S ou 35S du
30 virus de la mosaïque du Choux-Fleur (Odell et al., 1985, Nature, 313, 810-812), ou les promoteurs du virus de la mosaïque de la nervure du Manioc (tels que décrits dans la demande de brevet WO 97/48819). Parmi les promoteurs d'origine végétale on citera le promoteur du gène de

la petite sous-unité de ribulose-biscarboxylase/oxygénase (RuBisCO), le promoteur d'un gène d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 507 698, ou le promoteur d'un gène d'actine de riz (US 5,641,876). On peut également citer l'élément régulateur défini par l'association fonctionnelle d'un promoteur de gène d'histone associé à un intron de gène d'actine tel que décrit
5 dans la demande de brevet WO 99/34005.

Selon un autre mode particulier de réalisation de l'invention, le gène chimère contient un promoteur inductible. Un promoteur inductible est un promoteur qui ne fonctionne, c'est-à-dire qui n'induit l'expression d'une séquence codante, que lorsqu'il est lui-même induit par un agent inducteur. Cet agent inducteur est en général une substance qui peut être synthétisée dans
10 l'organisme hôte suite à un stimulus externe audit organisme, ce stimulus externe pouvant être par exemple un agent pathogène. L'agent inducteur peut également être une substance externe à cet organisme hôte capable de pénétrer à l'intérieur de celui-ci. De manière avantageuse, le promoteur utilisé dans la présente invention est inductible suite à l'agression de l'organisme hôte par un agent pathogène. De tels promoteurs sont connus, comme par exemple le promoteur du
15 gène d'O-méthyltransférase de classe II (COMT II) de plante décrit dans la demande de brevet FR 99 03700, le promoteur PR-1 d'*Arabidopsis* (Lebel et al., 1998, Plant J. 16(2):223-233), le promoteur EAS4 du gène de la sesquiterpène synthase du Tabac (Yin et al., 1997, Plant Physiol. 115(2), 437-451), ou le promoteur du gène codant la 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (Nelson et al., 1994, Plant Mol. Biol. 25(3):401-412).

20 Selon l'invention, le gène chimère peut également contenir en association avec la séquence de régulation promotrice, d'autres séquences de régulation, qui sont situées entre le promoteur et la séquence codante, telles que des activateurs de transcription ("enhancer"), comme par exemple l'activateur de translation du virus de la mosaïque du tabac (TMV) décrit dans la demande WO 87/07644, ou du virus etch du tabac (TEV) décrit par Carrington and Freed
25 (1990, J. Virol. 64, 1590-1597). Il peut également contenir un peptide signal ou un peptide de transit tel que décrit précédemment.

Parmi les éléments terminateurs pouvant être utilisés dans le gène chimère de la présente invention, nous pouvons citer à titre d'exemple l'élément terminateur *nos* du gène codant la nopaline synthase d'*Agrobacterium tumefaciens* (Bevan et al., 1983, Nucleic Acids Res. 11(2),
30 369-385), ou l'élément terminateur d'un gène d'histone tel que décrit dans la demande EP 0 633 317.

Pour les procédés de transformation des cellules végétales et de régénération des plantes,

on citera notamment les brevets et demandes de brevets suivants: US 4,459,355, US 4,536,475, US 5,464,763, US 5,177,010, US 5,187,073, EP 267,159, EP 604 662, EP 672 752, US 4,945,050, US 5,036,006, US 5,100,792, US 5,371,014, US 5,478,744, US 5,179,022, US 5,565,346, US 5,484,956, US 5,508,468, US 5,538,877, US 5,554,798, US 5,489,520, US 5,510,318, US 5,204,253, US 5,405,765, EP 442 174, EP 486 233, EP 486 234, EP 539 563, EP 674 725, WO 91/02071 et WO 95/06128.

Selon la présente invention, le gène chimère peut également être associé à un marqueur de sélection adapté à l'organisme hôte transformé. De tels marqueurs de sélection sont bien connus de l'homme du métier. Il pourra s'agir d'un gène de résistance aux antibiotiques, ou encore d'un gène de tolérance aux herbicides pour les plantes. De tels gènes de tolérance aux herbicides sont bien connus de l'homme du métier et notamment décrits dans les demandes de brevet EP 115 673, WO 87/04181, EP 337 899, WO 96/38567 ou WO 97/04103.

Les plantes transformées selon l'invention incluent également les plantes transformées issues de la culture et/ou du croisement des plantes régénérées ci-dessus, ainsi que les graines de plantes transformées.

Les plantes ainsi transformées sont résistantes à certaines maladies, en particulier à certaines maladies fongiques ou bactériennes, de préférence à des maladies fongiques telles que celles causées, par exemple, par un champignon du genre *Cercospora*, en particulier *Cercospora fijiensis*, du genre *Septoria* en particulier *Septoria nodorum* ou *Septoria tritici*, du genre *Fusarium*, en particulier *Fusarium nivale* ou *Fusarium graminearum*, du genre *Botrytis*, en particulier *Botrytis cinerea*, ou du genre *Rhizoctonia*, en particulier *Rhizoctonia solani*.

Bien entendu, les cellules et plantes transformées selon l'invention peuvent comprendre, en plus d'un gène chimère selon l'invention, au moins un autre gène chimère contenant un polynucléotide codant pour une protéine d'intérêt. Parmi les polynucléotides codant pour une protéine d'intérêt, on peut citer des polynucléotides codant une enzyme de résistance à un herbicide, par exemple le polynucléotide codant pour l'enzyme *bar* (White et al., NAR 18:1062, 1990) pour la tolérance au bialaphos, le polynucléotide codant pour l'enzyme EPSPS (US 5,188,642; WO 97/04103) pour la tolérance au glyphosate ou encore le polynucléotide codant pour l'enzyme HPPD (WO 96/38567) pour la tolérance aux isoxazoles. On peut également citer un polynucléotide codant pour une toxine insecticide, par exemple un polynucléotide codant pour une toxine de la bactérie *Bacillus thuringiensis* (pour exemple, voir International Patent

Application WO 98/40490). Peuvent également être contenus dans ces plantes d'autres polynucléotides de résistance aux maladies, par exemple un polynucléotide codant pour l'enzyme oxalate oxydase tel que décrit dans la demande de brevet EP 0 531 498 ou le brevet US 5,866,778, ou un polynucléotide codant pour un autre peptide antibactérien et/ou antifongique
5 tels que ceux décrits dans les demandes de brevets WO 97/30082, WO 99/24594, WO 99/02717, WO 99/53053, et WO99/91089. On peut également citer des polynucléotides codant pour des caractères agronomiques de la plante, en particulier un polynucléotide codant pour une enzyme delta-6 désaturase tel que décrit dans les brevets US 5,552,306, US 5,614,313, et demandes de brevets WO 98/46763 et WO 98/46764, ou un polynucléotide codant pour une enzyme sérine
10 acétyltransférase (SAT) tel que décrit dans les demandes de brevets WO 00/01833 et PCT/FR 99/03179.

Les autres séquences peuvent être intégrées au moyen du même vecteur comprenant un gène chimère, lequel comprend une première séquence codant pour la termicine et au moins une
15 autre séquence codant pour un autre peptide ou protéine d'intérêt.

Elles peuvent également être intégrées au moyen d'un autre vecteur comprenant au moins la dite autre séquence, selon les techniques usuelles définies ci-dessus.

Les plantes selon l'invention peuvent encore être obtenues par croisement de parents, l'un portant le gène selon l'invention codant pour la termicine, l'autre portant un gène codant pour au
20 moins un autre peptide ou protéine d'intérêt.

La présente invention concerne également un procédé de culture des plantes transformées selon l'invention, le procédé consistant à planter les graines des dites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture des dites plantes, à appliquer sur la dite surface
25 du dit champ une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle les dites graines ou les dites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

Par composition agrochimique, on entend selon l'invention toute composition agrochimique comprenant au moins un produit actif ayant l'une des activités suivantes,
30 herbicide, fongicide, bactéricide, virucide ou insecticide.

Selon un mode préférentiel de réalisation du procédé de culture selon l'invention, la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une activité

fongicide et/ou bactéricide, plus préférentiellement présentant une activité complémentaire de celle de la termicine produite par les plantes transformées selon l'invention.

Par produit présentant une activité complémentaire de celle de la termicine, on entend selon l'invention un produit présentant un spectre d'activité complémentaire, c'est à dire un produit qui sera actif contre des attaques de contaminants (champignons, bactéries ou virus) insensibles à la termicine, ou encore un produit dont le spectre d'activité recouvre celui de la termicine, totalement ou en partie, et dont la dose d'application sera diminuée de manière substantielle du fait de la présence de la termicine produite par la plante transformée.

La termicine est un peptide particulièrement actif contre les champignons et les levures et certaines bactéries, et peut être à ce titre employé à titre préventif ou curatif pour protéger différents organismes contre des agressions fongiques et/ou bactériennes. La présente invention concerne donc également la termicine à titre de médicament. Elle concerne également l'utilisation de la termicine pour le traitement des plantes contre des agressions fongiques et/ou bactériennes, en appliquant la termicine directement sur lesdites plantes.

La présente invention concerne également une composition comprenant une termicine selon l'invention et un véhicule approprié. Le véhicule approprié a pour première qualité de ne pas dégrader de manière substantielle la termicine dans la composition, et de ne pas diminuer les propriétés bactéricides et fongicides de la termicine. Par véhicule, on entend toute substance qui est ajoutée à la termicine dans la présente composition afin de favoriser essentiellement le transport et la protection de ladite termicine. Cette composition peut être une composition cosmétique et dans ce cas le véhicule approprié est cosmétiquement acceptable, adapté en outre pour une application sur la peau ou les phanères. La composition peut également être une composition pharmaceutique pour un usage thérapeutique en santé humaine ou animale, et dans ce cas le véhicule approprié est pharmaceutiquement acceptable, approprié pour une administration de la termicine par voie topique, per os ou par injection. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition peut être une composition agrochimique et dans ce cas le véhicule approprié est agrochimiquement acceptable, approprié pour une application sur les plantes ou à proximité des plantes, sans les dégrader. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la composition peut être une composition alimentaire pour l'alimentation animale ou humaine, et dans ce cas le véhicule approprié est alimentaires acceptable, c'est-à-dire compatible avec une assimilation de la composition par ingestion.

Les exemples ci-après permettent d'illustrer la présente invention, sans toutefois en limiter la portée.

Exemple I : Isolement et caractérisation de la termicine à partir de corps entiers ou de
5 cellules sanguines d'imagos (males ou femelles) naïfs ou immunisés de l'isoptère
Pseudacanthotermes spiniger

Exemple I.1 : Isolement de la termicine

**1-1 Induction de la synthèse biologique d'une substance antifongique dans l'hémolymph
de *Pseudacanthotermes spiniger***

10 Les imagos de l'isoptère champignoniste *Pseudacanthotermes spiniger* ont été immunisés
à l'aide d'une injection de 2 µl d'un mélange de 2500 cellules de *Micrococcus luteus* (Gram-
positive) et de 2500 cellules d'*Escherichia coli* 1106 (Gram-negative) préparées à partir de
cultures réalisées en milieu de Luria-Bertani durant 12 heures à 37°C. Les animaux ainsi infectés
ont été pendant 24 h dans une chambre humide contenant du terreau et maintenue à 25°C. Les
15 animaux sont sacrifiés par congélation et conservés jusqu'à utilisation au congélateur.

1-2 Préparation de l'extrait

Les termites (corps entiers) sont réduits en une fine poudre dans un mortier en présence
constante d'azote liquide. Un extrait peut être réalisé aussi bien sur des animaux mâles que
femelles, naïfs ou immunisés. Un extrait à partir de cellules sanguines ou de glandes salivaires
20 est également possible.

1-3 Acidification de l'extrait

Après réchauffement lent de la poudre obtenue, une solution d'acide trifluoroacétique à
0,1% est ajouté lentement afin d'obtenir un pH de l'extrait proche de 3. La solution qui permet la
réalisation de l'extrait contient outre de l'acide trifluoroacétique, un inhibiteur de protéases
25 (aprotinine à une concentration finale de 10 µg/ml) et un inhibiteur de la mélanisation
(phénylthiourée à 20 µM). L'extraction en condition acide du peptide a été réalisée pendant 30
min sous agitation légère dans un bain d'eau glacée. L'extrait obtenu a été ensuite centrifugé à
6°C pendant 30 min à 14000g.

I-4 Purification des peptides

30 a) **Prépurification par extraction en phase solide** Une quantité d'extrait équivalente à 200
individus a été déposée sur un support de phase inverse, tel que commercialisé sous la forme de
cartouche (Sep-Pak™ C₁₈, Waters Associates), équilibré avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %).

Les molécules hydrophiles ont été éliminées par un simple lavage avec de l'eau acidifiée. L'élution du peptide a été réalisée par une solution d'acétonitrile à 40% préparée dans le TFA 0,05%. La fraction éluée à 40% d'acétonitrile a été séchée sous vide dans le but d'éliminer l'acétonitrile et le TFA puis elle a été reconstituée dans de l'eau ultrapure stérile avant d'être soumise à la première étape de purification. Il est également possible de réaliser l'élution du peptide avec des concentrations d'acétonitrile en milieu acidifié comprises entre 20% et 100%.

b) Purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur colonne de phase inverse et colonne d'exclusion de taille.

-première étape : la fraction contenant le peptide a été analysée par chromatographie de phase inverse sur une colonne semi-préparative Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 220 x 7 mm, 300 Å), l'élution a été réalisée par un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 60% dans le TFA 0,05% pendant 120 minutes à un débit constant de 1,3ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 214 nm et 225 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antimicrobienne en utilisant les tests décrits ci-dessous.

- seconde étape : la fraction antimicrobienne correspondant au peptide a été analysée sur deux colonnes d'exclusion de taille montées en série (Ultraspherogel SEC 3000 et SEC 2000, 7.5 x 300 mm, Beckman™) et protégées par une pré-colonne (Ultraspherogel SEC, 7.5 x 40 mm, Beckman™). L'élution est réalisée en conditions isocratiques par 30% d'acétonitrile en présence de TFA 0,05% au débit de 0,4 ml/min. Les fractions sont récoltées en fonction de la variation de densité optique mesurée à 225 et 214 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antimicrobienne en utilisant les tests décrits ci-dessous.

- troisième étape : la fraction antimicrobienne correspondant au peptide a été analysée sur la même colonne en phase inverse que pour l'étape initiale, en utilisant comme conditions d'élution un gradient linéaire discontinu d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05%) de 2-15% en 10 min et de 15-45% en 120 min. Les fractions sont recueillies et analysées pour leur activité antimicrobiennes comme précédemment.

- quatrième étape : la fraction antimicrobienne est analysée sur une colonne analytique de phase inverse Aquapore OD-300 (220 x 4.6 mm, Brownlee™) et l'élution du composé d'intérêt réalisée par un gradient linéaire biphasique d'acétonitrile en eau acidifiée de 2-15% en 10 min

suivit par un gradient de 22-32% en 50 min au débit de 0,8 ml/min et à une température contrôlée de 30°C.

- **dernière étape de purification** : la dernière étape de purification est effectuée sur une colonne de phase inverse à faible diamètre interne dite "narrow bore" (Delta Pak HPIC₁₈, 2 x 150 mm, Waters™) à une température contrôlée à 30°C au débit de 0,2 ml/min. Le gradient utilisé pour effectuer cette dernière étape de purification est un gradient linéaire diphasique d'acétonitrile en milieu acide (TFA 0,05%) de 2-17% en 10 min et de 17-27% en 40 min. Les conditions de fractionnement ainsi que de détermination de l'activité antimicrobienne sont celles décrites pour les étapes antérieures (étapes 1 à 4, ci dessus).

Exemple L2 : caractérisation structurale de la termicine

2-1 Vérification de la pureté par électrophorèse capillaire de zone

La pureté du peptide antifongique a été vérifiée par électrophorèse capillaire de zone sur un modèle 270-HT (PEApplied Biosystems division de Perkin Elmer). 1 nl d'une solution à 50µM de peptide purifié a été injecté sous assistance par le vide dans un capillaire de silice (72 cm x 50 µm) et l'analyse a été réalisée en tampon citrate 20 mM à pH 2,5. L'électrophorèse a été réalisée à 20 kV de l'anode à la cathode pendant 20 min à 30°C. La migration a été enregistrée à 200 nm.

2-2 Détermination du nombre des cystéines : réduction et S-pyridyléthylation.

Le nombre de résidus cystéine a été déterminé sur le peptide natif par réduction et S-pyridyléthylation. 1 nanomole de peptide natif ont été réduites dans 40 µl de tampon Tris/HCl 0,5 M, pH 7,5 contenant 2 mM d'EDTA et 6 M de chlorure de guanidinium en présence de 2 µl de dithiothréitol 2,2 M. Le milieu réactionnel a été placé sous atmosphère d'azote. Après 60 min d'incubation à l'obscurité, 2 µl de 4-vinylpyridine fraîchement distillée ont été ajoutés à la réaction qui a été alors incubée durant 10 min à 45°C à l'obscurité et sous atmosphère d'azote. Le peptide pyridyléthylé a été ensuite séparé des constituants du milieu réactionnel par chromatographie de phase inverse en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile en présence de TFA 0,05%.

2-3 Détermination de la masse du peptide natif, du peptide S-pyridyléthylé et des fragments de protéolyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight).

Les mesures de masses ont été effectuées sur un spectromètre de masse MALDI-TOF

Bruker Biflex™ III (Bremen, Allemagne) en mode linéaire positif. Les spectres de masse ont été calibrés de façon externe avec un mélange standard de peptides de m/z connus, respectivement 2199.5 Da, 3046.4 Da et 4890.5 Da. Les différents produits à analyser ont été déposés sur une fine couche de cristaux d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique obtenue par une évaporation rapide d'une solution saturée dans l'acétone. Après séchage sous un léger vide, les échantillons ont été lavés par une goutte d'acide trifluoroacétique à 0,1% avant d'être introduits dans le spectromètre de masse.

2-4 Séquençage par dégradation d'Edman.

Le séquençage automatique par dégradation d'Edman du peptide natif, du peptide S-pyridyléthylé et des différents fragments obtenus après les différents clivages protéolytiques et la détection des dérivés phénylthiohydantoïnes ont été réalisés sur un séquenceur ABI473A (PEApplied Biosystems division de Perkin Helmer).

2-5 Clivages protéolytiques.

- Confirmation de la séquence peptidique dans la région C-terminale.

600 pmoles de peptide réduit et S-pyridyléthylé ont été incubées en présence d'endoprotéinase-Arg-C à un ratio de 1:50 en poids:poids (clivage spécifique des résidus arginine du côté C-terminal, Takara, Otsu) selon les conditions préconisées par le fournisseur (Tris HCl 10 mM pH 8 en présence de Tween 20 à 0,01%). L'incubation est réalisée durant 16 h à 37°C. Après arrêt de la réaction avec du TFA 0,05% ou toute autre solution acide inférieure à 3% final, les fragments peptidiques ont été séparés par HPLC en phase inverse sur une colonne de type Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters Associates, 150 x 2 mm) dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 0 à 60% en 90 min dans le TFA 0,05% avec un débit de 0,2 ml/min et une température constante de 30°C. Les fragments obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et le peptide correspondant au fragment C-terminal a été séquencé par dégradation d'Edman.

-Détermination de l'arrangement des ponts disulfure par protéolyse à la thermolysine.

Le peptide natif (6 µg) a été incubé durant 1 heure en présence de 3 µg de thermolysine (Boehringer Mannheim, rapport thermolysine/peptide, 1/2 en poids : poids) à 37°C dans le tampon MES (N-éthylmorpholine) 0,1 M à pH 7 en présence de 2 mM de CaCl₂. La réaction a été arrêtée par addition d'acide formique et les produits de la réaction ont été immédiatement séparés par chromatographie de phase inverse sur une colonne Narrowbore Delta-Pak™ HPIC₁₈ (Waters

Associates, 150 x 2,2 mm) dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 2 à 50% en 100 min dans du TFA 0,05% au débit de 0,2 ml/min à 30°C précédée d'une étape isocratique à 2 % d'acétonitrile pendant 10 min. Les fragments obtenues ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquencés par dégradation d'Edman.

Exemple II : Expression de termicine dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Toutes les techniques employées ci-après sont des techniques standards de laboratoire. Les protocoles détaillés de ces techniques ont été notamment décrits dans Ausubel *et al.* (1987, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Greene, Publ. Wiley & Sons)

Exemple II-1 Assemblage du gène synthétique

L'assemblage a été réalisé à partir de 6 oligonucléotides synthétiques codant pour les 36 acides aminés de la termicine précédés des 5 acides aminés C-terminaux de la préproséquence du facteur a1 (Mfa1) de la levure et suivie du reste peptidique additionnel constitué par l'acide aminé glycine (SEQ ID NO:3). Les oligonucléotides ont été choisis en tenant compte des codons préférentiels utilisés par *S. cerevisiae*.

L'assemblage s'est déroulé en plusieurs étapes :

- les oligonucléotides 2 à 5 ont été phosphorylés à leurs extrémités 5' par action de la polynucléotide kinase (New England Biolabs) ;

- les oligonucléotides 1 à 6 ont été mélangés, chauffés à 100°C et hybridés par diminution lente de la température à 25 °C pendant 3 heures ;

- les oligonucléotides hybridés ont été soumis à un traitement par la ligase du bactériophage T4 (New England Biolabs) pendant 15 heures à 15° C ;

- le bloc d'ADN résultant de l'hybridation des oligonucléotides représenté sur la figure 1, borné par les sites de restriction *Hin*DIII et *Sal* I, a été inséré dans le plasmide pBluescript SK+ (Stratagène) digéré par les enzymes *Hin*DIII et *Sal* I. Le mélange de ligation a ensuite été utilisé pour transformer des cellules compétentes d' *E. coli* DH5α. (Stratagène). Plusieurs clones ont été analysés et séquencés. Un de ces clones qui présentait la séquence recherchée a été appelé pJL187.

Exemple II-2 : Construction du vecteur qui permet la sécrétion de la termicine synthétisée.

Le fragment d'ADN HindIII-SalI du vecteur pJL187, portant la séquence codant la termicine ainsi que le fragment SphI-HindIII du vecteur M13JM132 (Michaut *et al.*, 1985, FEBS Letters, 395, pp 6-10, Lamberty *et al.*, 1999, JBC, 274, pp. 9320-9326) ont été insérés entre les sites SphI et SalI du plasmide pTG4812 (Michaut *et al.*, 1996, FEBS Letters, 395, pp 6-10, Lamberty *et al.*, 1999, JBC, 274, pp. 9320-9326). Le fragment SphI-HindIII du vecteur M13JM132 contient la séquence du promoteur du gène MF α 1 de la levure ainsi que la séquence codant la région pré-pro du facteur MF α 1. Dans le plasmide résultant, pJL193, le gène synthétique de la termicine se retrouve donc inséré entre les séquences pré-pro du facteur MF α 1 et le terminateur de transcription; cette construction doit donc assurer la maturation et la sécrétion de la termicine.

Exemple II-3 : Transformation d'une souche de *S. cerevisiae* par l'ADN du plasmide pSEA2 et analyse destransformants.

La souche de levure TGY 48.1 (MATa, ura3-D5, his, pral, prb1, prc1, cps1 ; Reichhart *et al.*, 1992, Invert. Reprod. Dev. 21, pp 15-24) a été transformée par le plasmide pJL193. Les transformants ont été sélectionnés à 29°C sur un milieu sélectif YNBG (0,67% yeast nitrogen base, 2% glucose), supplémenté avec 0,5 % de casamino acides et ne contenant pas d'uracile. Après transformation, plusieurs clones de levures, sélectionnés pour le caractère ura⁺, ont été mis en culture pendant 48 h à 29°C dans 50 ml de milieu sélectif.

Après centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C), le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, avant d'être déposé sur une cartouche Sep-PakTM C₁₈, (Waters Associates) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les différentes protéines fixées sur la cartouche ont été éluées par des solutions de TFA 0,05% contenant des pourcentages croissants d'acétonitrile.

La fraction 45 %, présentant une activité antimicrobienne, a été concentrée sous vide et soumise à une étape de purification par analyse en HPLC sur une colonne analytique de phase inverse Aquapore RP-300 C₈ (BrownleeTM, 220 x 4,6 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire d'acétonitrile de 2% à 40% en 80 min et de 17 à 27% en 60 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 0,8 ml/min. Les fractions ont été collectées manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antimicrobienne dans

les conditions décrites dans l'exemple III. La caractérisation structurale du peptide a été réalisée comme décrit dans l'exemple I.2.

Exemple II-4 : Production de termicine recombinante à l'échelle semi-préparative.

5 Un des clones de levure transformée exprimant la termicine a été cultivé à 29°C pendant 24 h dans 100 ml de milieu sélectif. Cette préculture a ensuite été utilisée pour inoculer 4 l de milieu sélectif et la culture a été réalisée pendant 48 h à 29 °C. Les levures ont été éliminées par centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C). Après centrifugation (4000 g, 30 min, 4°C), le surnageant a été acidifié jusqu'à pH 3,5 avec de l'acide acétique, avant d'être déposé sur une cartouche Sep-Pak™ C₁₈, (Waters Associates) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Les différentes protéines fixées sur la cartouche ont été éluées par des solutions de TFA 0,05% contenant des pourcentages croissants d'acétonitrile.

15 La fraction 45 %, présentant une activité antimicrobienne, a été concentrée sous vide et soumise à une étape de purification par extraction en phase solide sur une cartouche échangeuse de cations de type sep-Pak CM équilibrée dans 25 mM de tampon acétate d'ammonium à pH 3,6. Le peptide recombinant est élué par une solution à haute force ionique (par exemple 1M de chlorure de sodium) en tampon carbonate d'ammonium 25 mM à pH 3,6. Le peptide recombinant est désalé sur une cartouche Sep-Pak™ C₁₈, (Waters Associates) équilibrée avec de l'eau acidifiée (TFA 0,05 %). Le peptide recombinant retenu sur la cartouche est alors élué par 20 une solution d'acétonitrile en eau acidifiée (TFA 0,05%), une solution à 45% d'acétonitrile est avantageuse. La fraction contenant le peptide est purifiée par-analyse en HPLC sur une colonne préparative de phase inverse Aquapore RP-300 C₈ (Brownlee™, 250 x 10 mm, 300 Å), en utilisant un gradient linéaire discontinu d'acétonitrile de 2% à 17% en 10 min et de 17 à 27% en 60 min dans le TFA 0,05% avec un débit constant de 2,5 ml/min. Les fractions ont été collectées 25 manuellement en suivant la variation de l'absorbance à 225 nm et 254 nm. Les fractions recueillies ont été asséchées sous vide, reconstituées avec de l'eau ultrapure et analysées pour leur activité antimicrobienne dans les conditions décrites dans l'exemple III. La caractérisation structurale du peptide a été réalisée comme décrit dans l'exemple I.2.

Exemple III : Test d'activité *in vitro* : mesure de l'activité antimicrobienne par microspectrophotométrie.

Cette méthodologie a été utilisée pour la mise en évidence des molécules antimicrobiennes au cours des différentes étapes de purification, pour la détermination du spectre d'activité du peptide et pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) à laquelle le peptide a été actif. La CMI a été exprimée comme un intervalle de concentration [a] - [b] où [a] a été la concentration minimale où l'on observe un début de croissance et [b] la concentration pour laquelle aucune croissance n'a été observée. Des exemples de l'activité spécifique de la termicine, vis-à-vis des champignons filamenteux, des levures et des bactéries, sont donnés dans les tableaux 1 à 4.

Exemple III-1 : Test de détection d'activité contre les champignons filamenteux

L'activité antifongique a été détectée par un test d'inhibition de croissance en milieu liquide. Les spores des champignons à tester ont été mises en suspension dans un milieu de culture de type " Pomme de terre-Glucose ". De préférence, on utilise 12 g de milieu Potato Dextrose Broth (Difco) pour 1 l d'eau déminéralisée. Deux antibiotiques ont été rajoutés au milieu de culture : la tétracycline (concentration finale de 10 µg/ml) et la céfotaxime (100 µg/ml). On dépose 10 µl de chaque fraction à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 90 µl de milieu de culture contenant les spores (à une concentration finale de 10⁴ spores/ml). L'incubation a été réalisée en chambre humide à 30°C durant 48 heures. La croissance fongique a été observée au microscope photonique après 24 h et quantifiée après 48 heures par mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

- champignons filamenteux testés : , *Tricophyton mentagrophytes* (don du Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg) ; *Nectria haematococca*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma viride* (mycothèque de l'Université Catholique de Leuven, Belgique) ; *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*, (mycothèque de la Société Clause, Paris).

Les résultats du test d'activité de la termicine contre les champignons filamenteux sont reportés dans le Tableau 1 ci-dessous.

Tableau 1 : activité de la termicine contre les champignons filamenteux

Champignons	CMI de la termicine (µM)
<i>Neurospora crassa</i>	0,2-0,4
<i>Fusarium culmorum</i>	0,2-0,4
<i>Fusarium oxysporum</i>	0,8-1,5
<i>Nectria haematococca</i>	0,05-0,1
<i>Trichoderma viride</i>	6-12
<i>Tricophyton mentagrophytes</i>	6-12

Tableau 2 : activité de la termicine contre les champignons phytopathogènes. L'activité est ici exprimée par un pourcentage de croissance correspondant à $100 \times (1 - \text{absorbance avec produit} / \text{absorbance du témoin sans produit})$, l'absorbance étant mesurée à 600 nm, 5 jours après le début de l'expérience.

	Termicine 1 + 1 glycine			Termicine 2		
	40 ppm	20 ppm	10 ppm	40 ppm	20 ppm	10 ppm
<i>Cercospora fimensis</i>	95 %	68 %	65 %	90 %	70 %	70 %
<i>Botrytis cinerea</i>	30%	10%	4%	60%	30%	10%
<i>Septoria nodorum</i>	30%	20%	4%	40%	30%	20%
<i>Septoria tritici</i>	85%	80%	60%	90%	70%	70%
<i>Rhizoctonia solani</i>	34%	0%	0%	60%	60%	40%
<i>Fusarium germinarum</i>	90%	65%	20%	95%	60%	45%
<i>Fusarium nivale</i>	40%	30%	30%	60%	50%	45%

Les résultats du tableau 2 montrent une activité importante sur les champignons phytopathogènes.

Exemple III-2 : Test de détection d'activité contre les levures

Les différentes souches de levure ont été mises en incubation dans un milieu de culture de type " Sabouraud " et incubée à 30°C pendant 24 h sous agitation lente. L'échantillon à tester (10 µl) a été déposé dans des puits de plaque de microtitration dans lesquels ont été ajoutés 90 µl d'une culture diluée de levure dont la densité a été ajustée à DO 600 = 0,001. On évalue la croissance par la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

-levures testées : *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* (don du Dr H. Koenig, Hôpital civil, Strasbourg)

Les résultats du test d'activité de la termicine contre les levures sont reportés dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3: activité de la termicine contre les levures.

Levures	CMI de la termicine (µM)
<i>Candida albicans</i>	6-12
<i>Cryptococcus neoformans</i>	6-12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6-12

Les résultats des exemples III-1 et III-2 montrent l'excellente activité antifongique du peptide selon l'invention.

Exemple III-3 : Test de détection d'activité contre les bactéries

L'activité antibactérienne a été détectée par un test d'inhibition de croissance en milieu liquide. Les bactéries à tester ont été mises en suspension dans un milieu nutritif de type " Poor Broth " ou " Luria Bertani ". De préférence, on utilise une solution de bactotryptone à 10 g/l additionnée de NaCl à 5 g/l préparée dans de l'eau déminéralisée pour le " Poor Broth " et une solution de bactotryptone à 10 g/l, NaCl 10g/l, et extrait de levure 5 g/l à pH 7,4 pour le milieu Luria Bertani. On dépose 10 µl de chaque fraction à analyser dans des plaques de microtitration en présence de 90 µl de milieu de culture contenant les bactéries (à une concentration finale équivalente à 1mDO à 600 nm). L'incubation a été réalisée à 25°C durant 12 à 24 heures. La croissance bactérienne a été mesurée en suivant l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre lecteur de plaque de microtitration.

- bactéries testées : , *Bacillus megaterium* et *Micrococcus luteus* (collection de l'Institut Pasteur de Paris) ; *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pyogenes* (don du Pr. Monteil, Institut de bactériologie, Université Louis Pasteur de Strasbourg) pour les souches à Gram positif et *Escherichia coli* D22, *E. coli* SBS363 (don de Mr Boquet du Centre d'Etudes Nucléaires de Saclais) et *Pseudomonas aeruginosa* pour les germes à Gram négatif.

Les résultats du test d'activité de la termicine contre les bactéries, lorsqu'elles se sont avérées sensibles, sont reportés dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4: activité de la termicine contre les bactéries à Gram positif

Bactéries	CMI de la termicine (µM)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	25-50
<i>Micrococcus luteus</i>	50-100
<i>Bacillus megaterium</i>	50-100

Les résultats de l'exemple III-3 montrent une activité contre les bactéries à Gram positif.

Revendications

1- Polynucléotide isolé codant pour une termicine

5 2- Polynucléotide selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide sélectionné parmi le groupe consistant en:

(a) un polynucléotide isolé codant pour le peptide décrit par l'identificateur de séquence SEQ ID NO: 2

(b) un polynucléotide isolé s'hybridant au polynucléotide selon (a)

10 (c) un polynucléotide isolé homologue d'un polynucléotide selon (a) ou (b)

(d) un fragment d'un polynucléotide selon (a), (b), ou (c)

3- Polynucléotide selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend un polynucléotide représenté par l'identificateur de séquence SEQ ID NO:1

15

4- Polynucléotide isolé comprenant un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 3

5- Peptide antimicrobien de la famille des défensines, caractérisé en ce qu'il est codé par un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4

20

6- Peptide antimicrobien selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence d'acides aminés décrite par l'identificateur de séquence SEQ ID NO:2

7- Gène chimère comprenant au moins, liés entre eux de manière opérationnelle:

25

(a) un promoteur fonctionnel dans un organisme hôte

(b) un polynucléotide selon l'une des revendications 1 à 4

(c) un élément terminateur fonctionnel dans un organisme hôte

8- Gène chimère selon la revendication 7, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur constitutif

30

9- Gène chimère selon la revendication 7, caractérisé en ce que le promoteur est un promoteur inductible

5 10- Gène chimère selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend, en plus, un peptide signal ou un peptide de transit fonctionnel dans ledit organisme hôte

11- Gène chimère selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que l'organisme hôte est un microorganisme

10 12- Gène chimère selon la revendication 11, caractérisé en ce que le microorganisme est une levure

13- Gène chimère selon l'une des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que l'organisme hôte est une cellule végétale ou une plante

15

14- Vecteur d'expression ou de transformation contenant un gène chimère selon l'une des revendications 7 à 13

20 15- Vecteur selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il est un plasmide, un phage ou un virus

16- Organisme hôte transformé avec l'un des vecteurs selon l'une des revendications 14 ou 15

25 17- Organisme hôte selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un microorganisme

18- Organisme hôte selon la revendication 17, caractérisé en ce que le microorganisme est une bactérie de l'espèce *Escherichia coli*

30

19- Organisme hôte selon la revendication 17, caractérisé en ce que le microorganisme est une levure du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* ou *Pichia*

20- Organisme hôte selon la revendication 17, caractérisé en ce que le microorganisme est un baculovirus

5 21- Cellule végétale transformée contenant un gène chimère selon l'une des revendications 7 à 13

22- Plante transformée contenant un gène chimère selon l'une des revendications 7 à 13

10 23- Plante transformée selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'elle est résistante aux maladies fongiques telles que celles causées par des champignons du genre *Cercospora*, en particulier *Cercospora fijiensis*, du genre *Septoria* en particulier *Septoria nodorum* ou *Septoria tritici*, du genre *Fusarium*, en particulier *Fusarium nivale* ou *Fusarium graminearum*, du genre *Botrytis*, en particulier *Botrytis cinerea*, ou du genre *Rhizoctonia*, en particulier *Rhizoctonia solani*.

24- Partie d'une plante selon la revendication 23

25- Graines d'une plante selon la revendication 23

20

26- Procédé de production d'un peptide selon l'une des revendications 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de:

(a) culture d'un organisme hôte transformé selon l'une des revendications 16 à 20 ou d'une cellule végétale selon la revendication 21 dans un milieu de culture approprié,

25 (b) extraction et purification totale ou partielle du peptide selon l'une des revendications 5 ou 6 produit au cours de l'étape (a) par l'organisme hôte transformé

27- Composition comprenant un peptide antimicrobien selon l'une des revendications 5 ou 6 et un véhicule approprié.

30

28- Procédé de protection des plantes vis-à-vis d'organismes phytopathogènes, caractérisé en ce que l'on exprime dans lesdites plantes une termicine selon l'une des revendications 5 ou 6 par transformation desdites avec un vecteur selon l'une des revendications 14 ou 15

5 29- Procédé de culture de plantes transformées selon l'une des revendications 22 ou 23, caractérisé en ce qu'il consiste à planter les graines desdites plantes transformées dans une surface d'un champ approprié pour la culture desdites plantes, à appliquer sur ladite surface dudit champ une composition agrochimique, sans affecter de manière substantielle lesdites graines ou lesdites plantes transformées, puis à récolter les plantes cultivées lorsqu'elles arrivent à la
10 maturité souhaitée et éventuellement à séparer les graines des plantes récoltées.

30- Procédé de culture selon la revendication 29, caractérisé en ce que la composition agrochimique comprend au moins un produit actif ayant au moins une activité fongicide et/ou bactéricide.

15

31- Procédé de culture selon la revendication 30, caractérisé en ce que le produit actif présente une activité complémentaire de celle du peptide selon l'une des revendications 5 ou 6.

20

25

30

LISTE DE SEQUENCES

<110> RhoBio

<120> Peptides antimicrobiens de la famille des défensines,
polynucléotides codant ces peptides, vecteurs et
organismes transformés les contenant

<130> PRO 00033

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 112

<212> ADN

<213> *Pseudacanthotermes spiniger*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(108)

<400> 1

```

gct tgt aat ttc caa tct tgt tgg gcc acg tgt caa gct caa cat tct   48
Ala Cys Asn Phe Gln Ser Cys Trp Ala Thr Cys Gln Ala Gln His Ser
  1             5             10             15

```

```

att tac ttt aga aga gct ttc tgt gat aga tct caa tgt aaa tgt gtt   96
Ile Tyr Phe Arg Arg Ala Phe Cys Asp Arg Ser Gln Cys Lys Cys Val
          20             25             30

```

```

ttt gtt aga ggt taag
Phe Val Arg Gly
          35

```

<210> 2

<211> 36

<212> PRT

<213> *Pseudacanthotermes spiniger*

<400> 2

```

Ala Cys Asn Phe Gln Ser Cys Trp Ala Thr Cys Gln Ala Gln His Ser
  1             5             10             15

```

```

Ile Tyr Phe Arg Arg Ala Phe Cys Asp Arg Ser Gln Cys Lys Cys Val
          20             25             30

```

```

Phe Val Arg Gly
          35

```

<210> 3
 <211> 127
 <212> ADN
 <213> Séquence artificielle

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle: peptide
 signal Mfalpal et termicine

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(123)

<400> 3
 agc ttg gat aaa aga gct tgt aat ttc caa tct tgt tgg gcc acg tgt 48
 Ser Leu Asp Lys Arg Ala Cys Asn Phe Gln Ser Cys Trp Ala Thr Cys
 1 5 10 15
 caa gct caa cat tct att tac ttt aga aga gct ttc tgt gat aga tct 96
 Gln Ala Gln His Ser Ile Tyr Phe Arg Arg Ala Phe Cys Asp Arg Ser
 20 25 30
 caa tgt aaa tgt gtt ttt gtt aga ggt taag 127
 Gln Cys Lys Cys Val Phe Val Arg Gly
 35 40

<210> 4
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle:peptide
 signal Mfalpal et termicine

<400> 4
 Ser Leu Asp Lys Arg Ala Cys Asn Phe Gln Ser Cys Trp Ala Thr Cys
 1 5 10 15
 Gln Ala Gln His Ser Ile Tyr Phe Arg Arg Ala Phe Cys Asp Arg Ser
 20 25 30
 Gln Cys Lys Cys Val Phe Val Arg Gly
 35 40